



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12P 19/00, 19/32</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/11247</p> <p>(43) 国際公開日 1998年3月19日(19.03.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03225</p> <p>(22) 国際出願日 1997年9月12日(12.09.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/243120 1996年9月13日(13.09.96) JP 特願平8/285065 1996年10月28日(28.10.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)(JP/JP) 〒100 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 小泉聡司(KOIZUMI, Satoshi)(JP/JP) 〒194 東京都町田市中町3-9-10 Tokyo, (JP) 河野久治(KAWANO, Hisaji)(JP/JP) 〒747-02 山口県佐波郡徳地町岸見821 Yamaguchi, (JP) 木野邦器(KINO, Kuniki)(JP/JP) 〒747 山口県防府市協和町2-2-201 Yamaguchi, (JP) 尾崎明夫(OZAKI, Akio)(JP/JP) 〒194 東京都町田市中町3-9-13 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: PROCESSES FOR PRODUCING SUGAR NUCLEOTIDES AND COMPLEX CARBOHYDRATES</p> <p>(54)発明の名称 糖ヌクレオチド類および複合糖質の製造法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A process for producing a sugar nucleotide characterized by using as an enzyme source an optionally processed culture of a microorganism capable of producing the sugar nucleotide from a nucleotide precursor and a sugar, effecting an enzymatic reaction in an aqueous medium containing the enzyme source, the nucleotide precursor and the sugar to thereby accumulate the sugar nucleotide in the medium, and taking up the sugar nucleotide from the medium; and a process for producing a complex carbohydrate characterized by using as enzyme sources an optionally processed culture of a microorganism capable of producing a sugar nucleotide from a nucleotide precursor and a sugar, and an optionally processed culture of a microorganism or animal cells capable of producing the complex carbohydrate from the sugar nucleotide and a complex carbohydrate precursor, effecting enzymatic reactions in an aqueous medium containing these enzyme sources, the nucleotide precursor, the sugar and the complex carbohydrate precursor to thereby accumulate the complex carbohydrate in the medium, and taking up the complex carbohydrate from the medium.</p>		

(57) 要約

本発明は、ヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質および糖を含む水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に糖ヌクレオチドを生成蓄積させ、該水性媒体から糖ヌクレオチドを採取することを特徴とする糖ヌクレオチドの製造法、およびヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質、糖および複合糖質前駆体を含有する水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロベニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロバキア
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CG	コンゴ	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	IT	イタリア	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		

明 細 書

糖ヌクレオチド類および複合糖質の製造法

技術分野

本発明は、細菌・ウイルス等の感染防御、心血管障害への適応および免疫治療として有用な複合糖質の製造方法および該複合糖質の合成基質として重要である糖ヌクレオチドの製造方法に関する。

背景技術

糖ヌクレオチドの製造方法として、1) 化学合成法 [Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 28, 307 (1973)、Bull. Chem. Soc. Japan, 46, 3275 (1973) 、J. Org. Chem., 57, 146 (1992)、Carbohydr. Res., 242, 69 (1993)] 、2) 酵素を用いた製造方法 [J. Org. Chem., 55, 1834 (1992)、J. Org. Chem., 57, 152 (1992)、J. Am. Chem. Soc., 110, 7159 (1988)、特表平 7-508413、特表平 7-5000248、WO96/27670] 、3) 酵母等の微生物菌体を用いる方法 (特公昭 45-2073、特公昭 46-40756、特公昭 47-1837、特公昭 47-26703、特公昭 49-8278、特開平 2-268692) 、4) 耐塩性酵母の微生物菌体からの抽出法 (特開平 8-23993) 等が知られている。

1) の方法においては、高価なウリジン-5' -リン酸 (以下、UMP と略す) のモルフォリデート誘導体や糖リン酸等が必要であり、2) の方法においては、UMP、ウリジン-5' -二リン酸 (以下、UDP と略す)、ウリジン-5' -三リン酸 (以下、UTP と略す)、アデノシン-5' -三リン酸 (以下、ATP と略す) やホスホエノールピルビン酸、糖リン酸等の高価な原料やピルベートキナーゼ等多数の酵素が必要であり、3) の方法においては酵母菌体の乾燥処理を必要としたり、原料として高価なUMP等が用いられている。4) の方法を含め、上記いずれの方法においても、原料として高価なウリジンヌクレオチドや糖リン酸等が用いられていたり、操作的に大量生産が困難

であるため、今日に至るまで、糖ヌクレオチドの工業的規模での製造法は確立されていない。

複合糖質の製造法としては、1) 化学合成法 [Method in Enzymol. 247, 193 (1994)、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 21, 155 (1988)、Carbohydr. Res. 211, c1 (1991)]、2) 加水分解酵素 [Anal. Biochem. 202, 215 (1992)、Trends Biotechnol. 6, 256 (1988)] を用いる方法、および3) 糖転移酵素 (特開平 7-79792、特表平 7-500248、特公平 5-82200、W094/25614) を利用した方法が知られている。

1) の方法では立体選択的合成のためには保護基の導入が必須であり、2) の方法では収率・選択性が十分でなく、3) の方法においては高価な原料が必要であり、いずれの方法においても複合糖質の工業的な製造方法は確立されていない。

コリネバクテリウム属に属する微生物において、オロット酸を添加することにより、UMP が生産されとの報告がある [Amino Acid, Nucleic Acid, 23, 107 (1971)]。

発明の開示

本発明の目的は、細菌・ウイルス等の感染防御、心血管障害への適応および免疫治療などに有用な複合糖質の製造方法および該複合糖質の合成基質として重要である糖ヌクレオチドの安価で効率的な製造方法を提供することにある。

本発明者らは、微生物を用いて、糖ヌクレオチドを生産可能となるような方法を鋭意検討した結果、微生物の培養中、培地にヌクレオチドの前駆物質および糖を添加することにより糖ヌクレオチドが生産できることを見だし、更に、該糖ヌクレオチドを用いて複合糖質が生産できることを見だし本発明を完成するに至った。

本発明は、ヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力

を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質および糖を含む水性媒体中で酵素反応を行い、水性媒体中に糖ヌクレオチドを生成蓄積させ、該水性媒体から糖ヌクレオチドを採取することを特徴とする糖ヌクレオチドの製造方法を提供する。

更に、本発明はヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質、糖および複合糖質前駆体を含む水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造方法を提供する。

本発明によれば、1) ウリジンヌクレオチドや糖リン酸等の高価な原料を必要とせず、オロット酸等の安価なヌクレオチドの前駆物質および糖を原料として利用することができる、2) UDPからUTPへの転換において高価なホスホエノールピルビン酸とピルベートキナーゼの添加を必要としない、更に、3) 酵素の単離操作を必要としない等の特徴を有する糖ヌクレオチドの新規な製造法および該糖ヌクレオチド製造法を利用した新規な複合糖質の製造法を提供できる。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明の糖ヌクレオチドの製造に用いることのできる微生物としては、ヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物であればいずれも用いることができ、例えば、酵母に属する微生物をあげることができる。具体的には Saccharomyces 属、Candida 属、Pichia 属、Torulopsis 属、Debaryomyces 属、Zygosaccharomyces 属、Kluyveromyces 属、Hansenula 属、Brettanomyces 属に属する微生物をあげることができる。好ましい例として、Saccharomyces 属に属する微生物として、Saccharomyces cerevisiae 等を、Candida

属に属する微生物として、Candida utilis、Candida parapsilosis、Candida krusei、Candida versatilis、Candida lipolytica、Candida zeylanoides、Candida guilliermondii、Candida albicans、Candida humicola等を、Pichia属に属する微生物として、Pichia farinosa、Pichia ohmeri等を、Torulopsis属に属する微生物として、Torulopsis candida、Torulopsis sphaerica、Torulopsis xylinus、Torulopsis famata、Torulopsis versatilis等を、Debaryomyces属に属する微生物として、Debaryomyces subglobosus、Debaryomyces cantarellii、Debaryomyces globosus、Debaryomyces hansenii、Debaryomyces japonicus等を、Zygosaccharomyces属に属する微生物として、Zygosaccharomyces rouxii、Zygosaccharomyces bailii等を、Kluyveromyces属に属する微生物として、Kluyveromyces marxianus、Hansenula属に属する微生物として、Hansenula anomala、Hansenula jadinii等を、Brettanomyces属に属する微生物として、Brettanomyces lambicus、Brettanomyces anomalus等を挙げることができる。

更に、本発明の糖ヌクレオチドの製造に用いることのできる微生物として、通常の変異処理等の手段により、ヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を獲得し、または向上させた微生物をも用いることができる。

本発明の微生物の培養は、通常の培養方法に従って行うことができる。

該微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該微生物の培養を効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、シュクロース、ラクトース、マルトース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜、澱粉あるいは澱粉加水分解物等の炭水化物、ピルビン酸、乳酸、クエン酸、フマル酸等の各種有機酸、グルタミン酸、メチオニン、リジン等の各種アミノ酸、エタノール、プロパノール、グリセロール等のアル

コール類が用いられる。また、白糖、キャッサバ、バガス、コーン・ステープ・リカー等の天然有機栄養源も用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機および有機アンモニウム塩類、グルタミン酸、グルタミン、メチオニン等のアミノ酸、ペプトン、NZアミン、コーン・ステープ・リカー、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕、大豆粕加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、硫酸亜鉛、炭酸カルシウム等が用いられる。

ビタミン、アミノ酸、核酸等を必要に応じて添加してもよい。

培養は、振盪培養あるいは通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～45℃が良く、培養時間は通常5～100時間である。培養中pHは3～9に保持する。必要に応じて培地のpHの調整は無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア、pH緩衝液等を用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

該培養により得られた微生物の培養液および該培養液を種々処理した培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中で糖ヌクレオチドの生成に用いることができる。

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる細胞（菌体）、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、

該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品等を挙げることができる。

また、培養することなく、市販されている菌体、乾燥処理菌体等を糖ヌクレオチドの生成のための酵素源として使用することも可能で、該酵素源として、例えば、市販のパン酵母やビール酵母菌体等をあげることができる。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる酵素源の量は、湿菌体として、10～800 g/lであり、好ましくは50～600 g/lである。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリス等の緩衝液、メタノール、エタノール等のアルコール類、酢酸エチル等のエステル類、アセトン等のケトン類、アセトアミド等のアミド類等をあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

糖ヌクレオチドの生成において用いられるヌクレオチドの前駆物質としては、オロット酸、ウラシル、オロチジンおよびウリジン等をあげることができ、好ましくはオロット酸をあげることができる。該ヌクレオチドの前駆物質は、純品および該前駆物質の塩並びに夾雑物が反応を阻害しない限り、微生物により発酵生産された該前駆物質含有培養液および該培養液の該前駆物質粗精製物を用いることができる。ヌクレオチドの前駆物質は0.01～1.0 M、好ましくは0.01～0.3 Mの濃度で用いられる。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる糖としては、グルコース、ガラクトース、グルコサミンまたはN-アセチルグルコサミン等をあげることができる。

該糖は、純品を用いてもよいし、これらを含むもので、夾雑物が反応を阻害しないものであればいずれも用いることができ、0.01～1.0 Mの濃度で用いられる。

糖ヌクレオチドの生成において、必要に応じて、ATP再生に必要なエネルギー供与体、リン酸イオン、マグネシウムイオン、界面活性剤および有機溶剤を添加してもよい。

エネルギー供与体としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、ラクトース、マルトース、マンニトール、ソルビトール等の炭水化物、ピルビン酸、乳酸、酢酸等の有機酸、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等のアミノ酸、糖蜜、澱粉加水分解物等をあげることができ、0.02～2.0 Mの濃度で用いられる。

リン酸イオンとしては、正リン酸、ピロリン酸、トリポリリン酸、テトラポリリン酸、テトラポリメタリン酸等のポリリン酸、ポリメタリン酸、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム等の無機リン酸塩等をあげることができ、0.01～1.0 Mの濃度で用いることができる。

マグネシウムイオンとしては、硫酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、塩化マグネシウム等の無機マグネシウム塩、クエン酸マグネシウム等の有機マグネシウム塩等をあげることができ、通常1～20 mMの濃度で用いられる。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミン S-215、日本油脂社製）等の非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオン F2-40E、日本油脂社製）等のカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネート等のアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミン FB、日本油脂社製）等の三級アミン類等、各種糖ヌクレオチドの生成を促進するものであればいずれでも良く、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1～50 g/l、好ましくは1～20 g/lの濃度で用いられる。

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢

酸エチル等が挙げられ、通常 0.1 ~ 50 ml / l、好ましくは 1 ~ 20 ml / l の濃度で用いられる。

糖ヌクレオチドの生成反応は、水性媒体中、pH 5 ~ 10、好ましくは pH 6 ~ 8、20 ~ 50℃で 2 ~ 48 時間の条件で行うことができる。

該方法により糖ヌクレオチドを生成することが可能であり、該糖ヌクレオチドとして例えば、ウリジン二リン酸化合物等をあげることができる。具体的には、UDP-Glc、UDP-Gal、UDP-GlcNAc等をあげることができる。

水性媒体中に生成した糖ヌクレオチドの定量は公知の方法に準じて行うことができ、例えば、UDP-GlcとUDP-Galの分離定量は Anal. Biochem., 216, 188-194 (1994)記載の高速液体クロマトグラム（以下、HPLCと略す）による方法で行うことができる。また、UDP-GlcNAcの分離定量は以下の条件のHPLCにより行うことができる。

溶出液：0.1M KH_2PO_4

(H_3PO_4 を用いて pH 3.2 に調整)

流速：1 ml / min

カラム：Partisil-10 SAX（ワットマン社製）

検出：UV 262 nm

定量：スタンダードの吸光度値の比較により算出

反応液中に生成した糖ヌクレオチドの精製は、活性炭やイオン交換樹脂等を用いる通常の方法によって行うことができ（特開平 8-23993）、例えば、UDP-GalおよびUDP-Glcにおいては J. Org. Chem., 57, 152 (1992)、UDP-GlcNAcにおいては J. Org. Chem., 57, 146 (1992)に記載の方法に準じて行うことができる。

本発明の複合糖質の製造に用いることのできる微生物あるいは動物細胞としては、糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する

微生物あるいは動物細胞であればいずれも用いることができ、例えば、 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを産生するヒト・メラノーマ細胞WM 2 6 6 - 4 株 (ATCC CRL1676)、およびヒト・メラノーマ細胞WM 2 6 6 - 4 由来 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を含有するナマルバ細胞K J M - 1 株等の組換え株 (特開平 6-181759)、ヒト・メラノーマ細胞S K - M e l - 2 8 細胞由来のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する大腸菌 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 4638 (1996)、ヒトH e l a 細胞由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する大腸菌 (EMBO J., 9, 3171 (1990)) あるいは Saccharomyces cerevisiae [Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 160 (1994)]、ラット由来の β 1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子を発現するC O S - 7 細胞 (ATCC, CRL1651) [J. Biol. Chem., 268, 15381 (1993)] 等の動物細胞あるいは微生物をあげることができる。

本発明の複合糖質の製造に微生物を用いる場合には、該微生物を、上記ヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養と同様の培地、培養条件により培養することができる。

本発明の複合糖質の製造に動物細胞を用いる場合には、該動物細胞を培養する培地として、一般に使用されているR P M I 1 6 4 0 培地、E a g l e のM E M 培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、5 % C O₂ 存在下等の条件下で行う。培養温度は3 5 ~ 3 7 °C がよく、培養時間は、通常3 ~ 7 日間である。また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

該培養により得られた微生物あるいは動物細胞の培養液および該培養液を種々処理した培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中で複合糖質の生成に用いることができる。

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる細胞 (菌体)、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細

胞の界面活性剤処理物、該細胞の有機溶剤処理物、該細胞の溶菌酵素処理物、該細胞の固定化物あるいは該細胞からの抽出酵素標品等を挙げることができる。

複合糖質の生成において用いられる酵素源の量は、酵素の活性を、37℃、1分間に1 μ Mの複合糖質を生成することのできる活性を1単位(U)として、0.01U/l～100U/lであり、好ましくは0.1U/l～100U/lである。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリス等の緩衝液、メタノール、エタノール等のアルコール類、酢酸エチル等のエステル類、アセトン等のケトン類、アセトアミド等のアミド類等をあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

複合糖質の生成において用いられる糖ヌクレオチドとしては、上記糖ヌクレオチドの生成で得られた反応液あるいは該反応液から精製した糖ヌクレオチドを用いることができ、1～100mM、好ましくは5～100mMの濃度で用いることができる。

複合糖質の生成において用いられる複合糖質前駆体としては、糖類、オリゴサッカライド、蛋白質、ペプチド、糖蛋白質、糖脂質またはグリコペプチドを用いることができ、具体的にはN-アセチルグルコサミン、GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc等をあげることができる。複合糖質前駆体は0.1～100mM、好ましくは0.5～50mMの濃度で用いることができる。

該方法により、種々の複合糖質を生成することが可能であり、該複合糖質として、グルコース含有複合糖質、グルコサミン含有複合糖質、ガラクトース含有複合糖質、ガラクトサミン含有複合糖質、マンノース含有複合糖質、フコース含有複合糖質、ノイラミン酸含有複合糖質等をあげることができる。具体的にはラクトーN-テトラオース、ラクトーN-ネオテトラオース、N-アセチルラクトサミン等をあげることができる。

複合糖質の生成において、必要に応じて、 $MnCl_2$ 等の無機塩、 β -メルカプトエタノール等を添加することができる。

水性媒体中に生成した複合糖質の定量は公知の方法に準じて行うことができる（特開平 6-181759）。

反応液中に生成した複合糖質の採取は、活性炭やイオン交換樹脂等を用いる通常の方法によって行うことができ（特開平 8-23993）、例えば、N-アセチルラクタミンにおいては J. Org. Chem., 47, 5416 (1982) 記載の方法に準じて行うことができる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1. UDP-Glc の生産

グルコース 100 g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l、 K_2HPO_4 35 g/l、オロット酸（カリウム塩） 3 g/l の組成からなる反応液 2.5 L の入った 5 L 容培養槽に、市販のパン酵母（ダイヤイースト；協和発酵工業株式会社製）の乾燥処理物を 100 g/l（乾燥重量換算）となるように懸濁し、28℃、攪拌 600 rpm、通気量 2 L/min の条件で 6 時間反応を行った。

該反応中、4 N KOH を用いて、反応液の pH を 6.5 ~ 7.5 に維持した。

反応終了後、反応液上清中の UDP-Glc を Anal. Biochem., 216, 188-194 (1994) 記載の方法により定量した結果、UDP-Glc が 7.4 g/l（2 Na 塩換算）生成していた。

該反応液から遠心分離により菌体を除去し、得られた上清 2 L を用い、特開平 8-23993 記載の方法に準じて UDP-Glc を精製し、高純度の UDP-Glc

cを含有する溶出液を取得した。

該溶出液を濃縮後、99%エタノールを過剰量添加し、生じた沈殿物を真空乾燥し、6.8gの白色粉末を得た。該白色粉末は高純度（純度97%以上）のUDP-Glcであった。

実施例2. UDP-Galの生産

グルコース 50g/l、酵母エキス 2g/l、ペプトン 5g/l、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2g/l、 KH_2PO_4 2g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/l（6N H_2SO_4 でpH6.0に調整）の組成からなる液体培地を20ml添加した300ml容三角フラスコに、Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus ATCC16045株を植菌し、28℃、220rpmの条件で24時間振盪培養した。得られた培養液を1次種培養液として用いた。

ラクトース 50g/l、酵母エキス 2g/l、ペプトン 5g/l、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2g/l、 KH_2PO_4 2g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/l（6N H_2SO_4 でpH6.0に調整）の組成からなる液体培地を240ml添加した2L容バッフル付き三角フラスコに、該種培養液20mlを添加し、28℃、220rpmの条件で24時間振盪培養した。得られた培養液を2次種培養液として用いた。

ラクトース 100g/l、酵母エキス 2g/l、ペプトン 5g/l、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2g/l、 KH_2PO_4 2g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/l（6N H_2SO_4 でpH6.0に調整）の組成からなる液体培地を2.5L添加した5L容培養槽に、該2次種培養液250mlを植菌し、28℃、600rpm、通気量2.5L/minの培養条件で24時間培養を行った。

該培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液のpHを5.5（±0.1）に維持した。

培養終了後、該培養液にナイミーンS-215 4g/l、オロット酸（カ

リウム塩) 3 g/l、硫酸マグネシウム 1 g/l、 KH_2PO_4 3 g/l、 K_2HPO_4 4 g/l、ガラクトース 18 g/lを添加し、28℃、600 rpm、通気量 2.0 L/minの条件で15時間反応を行った。

該反応中、4 N KOHを用いて、反応液中のpHをpH 6.0～7.0に維持した。

反応終了後、上清中のUDP-GalをAnal. Biochem., 216, 188-194 (1994)記載の方法により定量した結果、UDP-Galが2.3 g/l (2 Na塩換算)生成していた。

該反応液から遠心分離により菌体を除去し、得られた上清2 Lから、実施例1と同様な方法で精製を行い、高純度(純度97%以上)のUDP-Galの白色粉末2.5 gを得た。

実施例3. UDP-GlcNAcの生産

グルコースの代わりにマルトース100 g/lを使用し、グルコサミン塩酸塩3.5 g/lを新たに反応液に添加する以外は、実施例1と同様な条件でUDP-GlcNAcの生産を行った。

反応終了後、反応液上清中のUDP-GlcNAcを上述のHPLC法により定量した結果、UDP-GlcNAcが7 g/l (2 Na塩換算)生成していた。

該反応液から遠心分離により菌体を除去し、得られた上清2 Lを用い、実施例1と同様な方法で精製を行い、高純度(純度97%以上)のUDP-GlcNAcの白色粉末5.7 gを得た。

実施例4. β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの調製

プロテインAのIgG結合領域と β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼとの融合蛋白質をコードしている遺伝子を含むプラスミドpAMoERSAW1

(特開平 6-181759) で形質転換したナマルバ K J M-1 株を G 4 1 8 (ギブコ社製) を 0.5 mg/ml 含む R P M I 6 4 0 · I T P S G F 培地 3 0 ml に 5×10^4 cells/ml になるように懸濁し、CO₂ インキュベーター中で、37℃、8 日間培養した。

該培養液から遠心分離により細胞を除き上清を回収した。該上清は、必要に応じて -80℃ で保存可能であり、使用前に解凍して使用することができる。

該プロテイン A の I g G 結合領域と β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼとの融合蛋白質の生成された培養上清にアジ化ナトリウムを最終濃度 0.1% になるように添加した後、製品説明書に従って前処理した I g G セファロース (ファルマシア社製) を 50 μ l 添加し、4℃ で一晩緩やかに攪拌した。

攪拌後、遠心分離により β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの結合した I g G セファロースを回収し、R P M I 6 4 0 · I T P S G F 培地 1 ml で 3 回洗浄後、該 I g G セファロースを β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの酵素源として用いた。

実施例 5. ラクトー N-テトラオースの生産

ラクトー N-ネオテトラオース (オックスフォード・グライコシステムズ社製) を常法 [Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)] に従ってアミノピリジンにより蛍光標識した後、100 unit の β -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製) を加えて 37℃ で 16 時間反応させ、非還元末端のガラクトースを除去した。

該反応液を、5 分間、100℃ で加熱し、 β -ガラクトシダーゼを失活させた。

該反応により得られた GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc を複合糖質前駆体として用いた。

該複合糖質前駆体 0.5 mM、実施例 4 で取得した I g G セファロース結

合 β 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ 0.5 U、実施例 2 で取得した UDP-Gal 5 mM、Tris-HCl (pH 7.9) 100 mM、 $MnCl_2$ 10 mM、 β -メルカプトエタノール 2 mM を含有する反応液 36 μ l を、32 °C で 65 時間放置し、反応を行った。

反応終了後、該反応液に蓄積された生成物を下記条件で HPLC を用いて定量した。

カラム : TSKgel ODS-80TM カラム (4.6mmx30cm, TOSOH 社製)

液相 : 0.02 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0)

温度 : 50 °C

流速 : 1 ml/min

検出 : 蛍光検出器 (励起波長 320 nm、放射波長 400 nm)

生成物の同定はアミノピリジンで標識したラクト-N-テトラオースと標識された生成物の溶出時間を比較することにより行った。

該反応により、0.17 mM (0.12 g/l) のラクト-N-テトラオースが生成した。

実施例 6. ラクト-N-ネオテトラオースの生産

実施例 5 で調製した複合糖質前駆体 GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 0.5 mM、 β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (シグマ社製) 0.5 U、実施例 2 で取得した UDP-Gal 5 mM、Tris-HCl (pH 7.9) 100 mM、 $MnCl_2$ 10 mM、 β -メルカプトエタノール 2 mM、 α -ラクトアルブミン 0.2 mg/ml を含有する反応液 36 μ l を、32 °C で 65 時間放置し、反応を行った。

反応終了後、該反応液に蓄積された生成物を実施例 5 と同様の条件で、HPLC を用いて定量した。生成物の同定はアミノピリジンで標識したラクト-N-ネオテトラオースと生成物の溶出時間を比較することにより行った。

該反応により、0.2 mM (0.14 g/l) のラクトーN-ネオテトラオースが生成した。

産業上の利用可能性

本発明により、ヌクレオチドの前駆物質および糖から、糖ヌクレオチドを、該糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体より複合糖質を工業的に効率よく製造できる。

請求の範囲

1. ヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質、糖および複合糖質前駆体を含有する水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法。

2. ヌクレオチドの前駆物質および糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質および糖を含む水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に糖ヌクレオチドを生成蓄積させ、該水性媒体から糖ヌクレオチドを採取することを特徴とする糖ヌクレオチドの製造法。

3. 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、複合糖質および請求項2記載の製造法により得られた糖ヌクレオチドを含有する水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法。

4. 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる細胞、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品であることを特徴とする、請求項1、2または3記載の製造法。

5. ヌクレオチドの前駆物質が、オロット酸、ウラシル、オロチジンお

よびウリジンから選ばれるヌクレオチドの前駆物質である、請求項 1 または 2 記載の製造法。

6. 糖ヌクレオチドが、ウリジン二リン酸化合物である、請求項 1、2 または 3 記載の製造法。

7. ウリジン二リン酸化合物が、ウリジン二リン酸グルコース、ウリジン二リン酸ガラクトース、ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン、ウリジン二リン酸-N-アセチルガラクトサミンから選ばれるウリジン二リン酸化合物である、請求項 6 記載の製造法。

8. 糖が、グルコース、ガラクトース、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミンから選ばれる糖である、請求項 1 または 2 記載の製造法。

9. 複合糖質前駆体が、糖類、オリゴサッカライド、蛋白質、ペプチド、糖蛋白質、糖脂質およびグリコペプチドから選ばれる複合糖質前駆体である、請求項 1 または 3 記載の製造法。

10. 複合糖質前駆体が、N-アセチルグルコサミンまたは $\text{GlcNAc } \beta\text{-1-3Gal } \beta\text{-1-4Glc}$ である、請求項 9 記載の製造法。

11. 複合糖質が、グルコース含有複合糖質、グルコサミン含有複合糖質、ガラクトース含有複合糖質、ガラクトサミン含有複合糖質、マンノース含有複合糖質、フコース含有複合糖質またはノイラミン酸含有複合糖質である、請求項 1 または 3 記載の製造法。

12. ガラクトース含有複合糖質が、ラクトー-N-テトラオースおよびラクトー-N-ネオテトラオースから選ばれる複合糖質である、請求項 11 記載の製造法。

13. ヌクレオチドの前駆物質および糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が酵母であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の製造法。

14. 酵母が、Saccharomyces 属、Candida 属、Pichia 属、Torulopsis 属、Debaryomyces 属、Zygosaccharomyces 属、Kluyveromyces 属、Hansenula 属および Brettanomyces 属に属する微生物から選ばれる酵母であることを特徴とする、請求項 13 記載の製造法。

15. 酵母が、Saccharomyces cerevisiae、Candida utilis、Candida parapsilosis、Candida krusei、Candida versatilis、Candida lipolytica、Candida zeylanoides、Candida guilliermondii、Candida albicans、Candida humicola、Pichia farinosa、Pichia ohmeri、Torulopsis candida、Torulopsis sphaerica、Torulopsis xylinus、Torulopsis famata、Torulopsis versatilis、Debaryomyces subglobosus、Debaryomyces cantarellii、Debaryomyces globosus、Debaryomyces hansenii、Debaryomyces japonicus、Zygosaccharomyces rouxii、Zygosaccharomyces bailii、Kluyveromyces marxianus、Hansenula anomala、Hansenula jadinii、Brettanomyces lambicus および Brettanomyces anomalus から選ばれる酵母である、請求項 14 記載の製造法。

16. 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する微生物が、Escherichia coli または Saccharomyces cerevisiae であることを特徴とする請求項 1 または 3 記載の製造法。

17. 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する動物細胞が、COS-7 細胞またはナマルバ KJM-1 細胞であることを特徴とする請求項 1 または 3 記載の製造法。

18. ナマルバ KJM-1 細胞が、 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含む DNA 断片とベクターとの組換え体 DNA を保有するナマルバ KJM-1 細胞であることを特徴とする、請求項 17 記載の製造法。

19. β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子がヒト・メラノーマ細胞由来であることを特徴とする、請求項 18 記載の製造法。

20. 動物細胞が、ナマルバ KJM-1/pAMoERSAW1 であることを特徴とする、請求項 18 記載の製造法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03225

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12P19/00, C12P19/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12P19/00, C12P19/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X / Y	Hiroshi Aida and three others "Applied Microbiology II (in Japanese)" 7th edition, Asakura Shuppan, April 1, 1979 (01. 04. 79), p. 71-72	2, 4-8, 13-15/ 1, 3, 9-12, 16-20
Y	Willem M. Blanken, Dirk H. Van den Eijnden "Biosynthesis of terminal Gal α 1+3Gal β 1+4GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates" The Journal of Biological Chemistry Vol. 260, No. 24, (1985) p. 12927-12934	1, 3, 9-12, 16-20
Y	Mary A. Carver, Salvatore J. Turco "Cell-free biosynthesis of lipophosphoglycan from Leishmania donovani" The Journal of Biological Chemistry Vol. 266, No. 17, (1991) p. 10974-10981	1, 3, 9-12, 16-20
Y	David H. Joziassse, et al. " α 1+3-Galactosyltransferase: the use of recombinant enzyme for the synthesis of α -galactosylated glycoconjugates" European Journal of Biochemistry	1, 3, 9-12, 16-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

October 23, 1997 (23. 10. 97)

Date of mailing of the international search report

November 5, 1997 (05. 11. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03225

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Vol. 191, (1990), p. 75-83 Nathan Sharon, translated by Toshiaki Osawa "Complex Carbohydrates (in Japanese)" first edition, Gakkai Shuppan Center, October 10, 1977 (10. 10. 77), p. 264-266	1, 3, 9-12, 16-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^{*}: C12P19/00, C12P19/32

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^{*}: C12P19/00, C12P19/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X / Y	相田 浩 外3名著「応用微生物学 II」第7版 朝倉出版 1. 4月. 1979 (01. 04. 79) p. 71-72	2,4-8.13-15 / 1.3.9-12.16-20
Y	Willem M. Blanken, Dirk H. Van den Eijnden "Biosynthesis of terminal Gal α 1-3 Gal β 1-4GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates" The Journal of Biological Chemistry 第260巻, 第24号, (1985) p.12927-12934	1.3.9-12.16-20
Y	Mary A Carver, Salvatore J. Turco "Cell-free biosynthesis of lipophosphoglycan from Leishmania donovani" The Journal of Biological Chemistry 第266巻, 第17号, (1991) p.10974-10981	1.3.9-12.16-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 10. 97

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤田 節

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

4B 8515

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	David H. Joziase. et al' α 1-3-Galactosyltransferase: the use of recombinant enzyme for the synthesis of α -galactosylated glycoconjugates" European Journal of Biochemistry 第191巻, (1990) p. 75-83	1.3.9-12.16-20
Y	Nathan Sharon 著 大沢 利昭 訳 「複合糖質」初版 学会出版センター 10. 10月, 1977 (10. 10. 77) p. 264-266	1.3.9-12.16-20